



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/02087 (43) Date de publication internationale: 21 février 1991 (21.02.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00585 (22) Date de dépôt international: 2 août 1990 (02.08.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/10802 11 août 1989 (11.08.89) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BERTIN & CIE [FR/FR]; BP N° 3, F-78373 Plaisir Cédex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : COHEN, Daniel [FR/FR]; 5, rue Jeanne-d'Arc, F-94160 S.-Mandé (FR). DUFAU, Frédéric [FR/FR]; 9, hameau de Bois-Fontaine, F-78170 La Celle-S.-Cloud (FR). HACHE, Jean [FR/FR]; 3, allée de l'Epée, F-78960 Voisins-le-Bretonneux (FR). JEANPIERRE, Marc [FR/FR]; 94, rue Lecourbe, F-75015 Paris (FR). GINOT, Frédéric [FR/FR]; 92, rue de la Procession, F-75015 Paris (FR). MARTINEZ, Marie-Christine [FR/FR]; 2, rue du Colonel-Candelot, F-92340 Bourg-la-Reine (FR). ROUSSEL, Brigitte [FR/FR]; 63, voie des Sculpteurs, Résidence Les Platanes, F-92800 Puteaux (FR). TROTON, Agnès [FR/FR]; 12, place Bonsergent, F-75010 Paris (FR).		(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, NO, US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: FAST PROCESS FOR DETECTING AND/OR IDENTIFYING A SINGLE BASE ON A NUCLEIC ACID SEQUENCE AND ITS APPLICATIONS (54) Titre: PROCEDE RAPIDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION D'UNE SEULE BASE SUR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, ET SES APPLICATIONS (57) Abstract The feature of this process is that: (1) the sequence on which the base to be identified is located is made hybrid with a nucleotide of adequate length; (2) the synthesis of the complementary strand of the hybrid obtained in (1) is started, said nucleotide acting as a trigger, in the presence of: a polymerase without 3'5' exonuclease action; and at least one modified nucleotide base; (3) the incorporated blocking nucleotide base is detected by any suitable means. Application: diagnosis of genetic diseases. (57) Abrégé Procédé de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique. Ce procédé est caractérisé en ce que: (1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante; (2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), -ledit nucléotide servant d'amorce- en présence: d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et d'au moins une base nucléotidique modifiée; (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié. Application: diagnostic des maladies génétiques.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brsil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	LU	Luxembourg	TC	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

PROCEDE RAPIDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION D'UNE SEULE BASE SUR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, ainsi qu'à ses applications, notamment dans le diagnostic des maladies génétiques et dans le contrôle d'une hybridation.

L'hybridation d'acide nucléique a été utilisée pour étudier l'identité et établir la présence d'acides nucléiques. L'hybridation est basée sur l'appariement de bases complémentaires. Lorsque des acides nucléiques simple brin complémentaires sont incubés ensemble, lesdits acides nucléiques simple brin s'apparient pour former une molécule hybride double brin. La capacité de l'ADN simple brin ou de l'ARN à former une structure avec une séquence d'acide nucléique complémentaire est utilisée comme méthode d'analyse et de diagnostic. La disponibilité de nucléosides triphosphates radioactifs ayant une activité spécifique importante et le marquage de l'ADN au ^{32}P en présence d'enzymes à fonction polymérase, par exemple la T_4 kinase, a permis d'identifier, d'isoler et de caractériser de nombreuses séquences d'acides nucléiques d'intérêt biologique.

L'hybridation représente un critère important dans la détection de la présence de séquence d'acide nucléique particulières comme par exemple :

- dans les maladies génétiques humaines ou animales où une modification héréditaire du patrimoine génétique a des conséquences morbides (par insertion, délétion ou mutation ponctuelle d'une séquence particulière) ;

- dans les maladies cancéreuses, où des réarrangements de l'ADN génomique sont observés ;

- au cours des infections où l'on décèle la présence de génomes étrangers tels que celui des

microorganismes (bactéries, champignons et virus par exemple) ;

- pour l'identification des individus en général :

5 . en médecine légale (paternité, filiation par exemple),

. dans le domaine agroalimentaire (plantes, contrôle sanitaire par exemple).

Cependant, l'hybridation comme outil de diagnostic peut être limitée par la difficulté de sa mise en oeuvre (techniques lourdes) ou par l'absence de spécificité de l'hybridation (protocole opératoire).

En effet, l'étude chimique de l'hybridation a mis en évidence l'influence de la concentration de chacun des brins d'acides nucléiques impliqués, de leurs longueurs, de leurs compositions en bases, de la température, du pH, de la force ionique, de la viscosité du milieu.

La température notamment, est critique et doit rester inférieure à la température de fusion (T_m : température à laquelle 50 % des séquences sont sous forme double brin). En solution, la température optimale d'hybridation est 25°C en dessous de la T_m pour une sonde de 150 nucléotides et légèrement plus basse pour les sondes plus courtes.

Ainsi lorsque l'on veut détecter une mutation portant sur une seule base, on peut généralement utiliser, selon les cas, deux types de sondes : des sondes d'acide nucléique dites longues, supérieures à 150 nucléotides en général, ou des sondes d'acide nucléique dites courtes entre 17 et 24 nucléotides en général. Si la mutation intervient dans un site reconnu spécifiquement par une enzyme dite de restriction, on peut utiliser la technique de Southern : celle-ci comporte les étapes d'isolement de l'ADN, de digestion par l'enzyme de restriction, d'électrophorèse sur gel, de transfert sur une

membrane et d'hybridation à l'aide d'une sonde longue intéressant la région de la mutation ; après lavage et autoradiographie, l'analyse des tailles des fragments obtenus permet d'infirmar ou confirmer la présence de la mutation. Le procédé très lourd nécessite que la mutation intéresse un site de restriction. Si ce n'est pas le cas, on peut synthétiser une sonde courte oligonucléotidique de 17 à 24 nucléotides dont le centre coïncide avec la mutation que l'on veut détecter. En choisissant des conditions appropriées d'hybridation et de rinçage (spécifique de chaque système), on ne peut obtenir une hybridation à l'aide de l'oligonucléotide marquée qu'en cas d'homologie parfaite (une seule différence nucléotidique, notamment à l'endroit de la mutation, entraîne la déstabilisation de l'hybridation).

Cependant, ces différentes méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients:

- conditions de température difficiles à maîtriser, pour obtenir une hybridation appropriée ;
- éventuellement présence obligatoire d'un site de restriction ;
- immobilisation de l'acide nucléique sur membrane (Southern blot).

Le Brevet Américain AMERSHAM n° 4 656 127, a permis de pallier certains de ces inconvénients, notamment en ce qu'il permet de détecter une mutation présente à un endroit ne présentant pas de site de clivage par une enzyme de restriction.

Ce Brevet Américain n° 4 656 127, décrit une méthode de détection de la mutation d'une base nucléotique spécifique dans un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) cible par :

- (a) hybridation d'une sonde avec la séquence cible pour former un hybride d'acide nucléique, dans lequel une extrémité de la sonde est hybridée de manière adjacente à la base nucléotidique spécifique ;

(b) mélange de l'hybride avec un dérivé nucléotidique dans des conditions appropriées à l'élongation de la sonde, de manière à permettre la jonction dérivé nucléotidique - extrémité de la sonde, seulement si la base spécifique dans la séquence cible est (ou n'est pas) la mutation à détecter, une sonde associée audit dérivé nucléotidique étant résistante à une digestion dans des conditions particulières ;

(c) digestion de l'hybride par une exonucléase dans des conditions telles que le fragment double brin est progressivement digéré à partir de l'extrémité de la sonde à moins que ladite extrémité ait été mise en jonction avec ledit dérivé nucléotidique ;

(d) élimination des portions de la sonde qui ne sont plus hybridées à la chaîne d'acide nucléique ;

(e) et détection d'une mutation de la base nucléotidique spécifique dans la séquence cible par détection de la présence ou de l'absence de la sonde après digestion.

Ce procédé implique en particulier en plus de la sonde, l'utilisation d'un dérivé nucléotidique ayant des propriétés particulières et comporte de ce fait encore de nombreuses étapes. De plus, il nécessite, pour sa réalisation, une immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane et également un marquage (de la sonde ou du dérivé nucléotidique).

La présente invention s'est en conséquence, donné pour but de pourvoir à un procédé d'identification d'une base nucléotidique spécifique, aisé et rapide à mettre en oeuvre, qui répond mieux aux nécessités de la pratique que les procédés de l'Art antérieur, notamment en ce que le procédé conforme à l'invention ne nécessite pas un protocole opératoire complexe, c'est-à-dire ne nécessite ni immobilisation de l'ADN, ni marquage de la sonde, et s'applique à la détection de séquences d'acide nucléique particulières, notamment dans les maladies génétiques, les maladies cancéreuses, les infections,

l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

La présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :

(1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de réaction, ledit nucléotide s'hybridant avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :

- d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'élongation dudit produit d'extension ;

(3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

On entend par nucléotide, au sens de la présente invention, aussi bien un oligonucléotide, qui comprend de 10 à 50 bases qu'un nucléotide pouvant comprendre plus de cent bases.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des sub-

stances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

5 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

Selon une modalité de cette disposition, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre
10 nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides
15 bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, on détecte, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation.

20 En effet, la réaction de polymérisation génère la production d'un pyrophosphate, comme suit :
matrice - amorce + dNTP ----> matrice - (amorce + dNMP) + PP_i.

En mesurant le pyrophosphate dans chaque tube
25 de réaction, il est possible de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, on détecte chaque base nucléotidique marquée.

30 En effet, chaque tube de réaction contient, en ce cas, une seule base nucléotidique marquée, les trois autres ne l'étant pas ; la mesure de la base marquée (par fluorescence, radioactivité...) permet de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est
35 produite, les bases marquées non incorporées étant éliminées par lavage.

Le procédé conforme à l'invention a notamment l'avantage de permettre de définir les conditions opératoires, indépendamment de la base nucléotidique à identifier et de ne pas nécessiter d'immobilisation de l'acide
5 nucléique sur une membrane.

La présente invention a également pour objet un kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs et tampons adaptés à la mise en oeuvre
10 du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide (servant d'amorce) capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la
15 base nucléotidique spécifique à détecter ;
- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension ; et
- 20 - des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3'5'.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides (ddTTP, ddGTP, ddATP, ddCTP).

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anti-
30 corps appropriés.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du
5 complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de
10 l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : diagnostic de la drépanocytose par le procédé conforme à l'invention (mesure des didésoxynucléotides fluorescents).

15 La drépanocytose ou anémie falciforme est due à une mutation dans l'un des exons du gène β codant pour la chaîne β de l'hémoglobine (Hb). Cette mutation consistant en une substitution d'une adénine (A) par une thymine (T), modifie le codon GAG, traduit en un acide glutamique (en position G) dans l'Hb normale, en codon GTG,
20 traduit en une valine dans l'Hb anormale (HbS).

L'ADN qui a été utilisé dans cet exemple correspond à une séquence d'ADN amplifié simple-brin.

a) Blocage des amorces d'amplification.

25 * mélanger dans un tube de microcentrifugation, pour chaque ADN matrice :

- 100 ng d'ADN (simple-brin amplifié)

- 7 μ l de tampon Sequenase 5X (= Tris-HCl pH 7,5, 200 mM ; NaCl, 250 mM ; MgCl₂, 100 mM)

30 - H₂O qsp 22 μ l

* agiter à l'aide d'un vortex et centrifuger rapidement

* incuber au bain-marie à 95°C pendant 2 minutes.

* enlever vite et placer au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.

- * préparer le tampon de réaction pour un échantillon d'ADN, constitué de :
- 2,5 µl DTT 0,1 M
 - 1 µl d'un mélange de ddNTP, dilué au 1/400 (ddTTP : 112 µM ; ddGTP : 1,12 µM ; ddATP : 3,36 µM ; ddCTP : 8,96 µM) ; et
 - H₂O qsp 6,5 µl
 - Sequénase 1 µl (3 unités)
- * enlever les tubes du bain-marie et centrifuger rapidement,
- * ajouter le tampon de réaction et mélanger,
- * placer au bain-marie à 37°C, pendant 5 minutes,
- * enlever les tubes et les placer dans la glace.
- b) Elimination des didésoxynucléotides froids en excès
- On utilise les systèmes de microséparation Centricon 3 ou 10 (Amicon) qui, par filtration sur membrane accélérée par centrifugation, permettent de retenir des espèces moléculaires de poids moléculaire supérieur à 3 000 ou 10 000 Daltons (par exemple: un nucléotide correspond à 330 D et un oligonucléotide de synthèse de 20 meres correspond à 6 600 D).
- disposer le volume réactionnel issu de a) dans un "Centricon" 3 ou 10 et diluer si nécessaire,
 - centrifuger à moins de 5 000 g en suivant les instructions du fabricant, de façon à récupérer un volume minimal,
 - inverser le système "Centricon",
 - centrifuger pour récupérer le volume réactionnel,
 - ramener le volume obtenu à 12 µl.
- c) Microséquençage (procédé conforme à l'invention)
- * Pour chaque tube d'ADN, ajouter aux 12 µl :
- 15 ng d'oligonucléotide 5' CATGGTGCACCTGACTCCTG 3' (OA), correspondant à la séquence s'arrêtant à la base adjacente à la position de la mutation
 - 7 µl de Tampon Sequénase 5X tel que défini en a) ci-dessus et procéder comme dans a) ; puis

* préparer le tampon de réaction constitué pour chaque échantillon de :

- 2,5 µl DTT 0,1 M

- 1 µl d'une dilution au 1/400ème d'un mélange de ddNTP
5 fluorescents (ddTTP* : 112µM ; ddGTP* : 1,12µM ; ddATP* :
3,36µM ; ddCTP* : 8,96µM). Les didésoxynucléotides
fluorescents sont vendus par Du Pont (Genesis™ 2000 DNA
Analysis System) ;

- H₂O qsp 6,5 µl

10 - Sequenase 1 µl (3 unités)

* enlever les tubes du bain-marie, centrifuger rapide-
ment,

* ajouter le tampon de réaction, mélanger,

* placer au bain-marie à 37°C, pendant 5 mns,

15 * enlever les tubes et placer les dans la glace.

d) Lavage des didésoxynucléotides fluorescents en excès:

* passer les échantillons sur colonne de Sephadex G50,

* récupérer les éluats.

e) Détection

20 La détection se fait pour chaque échantillon
après migration électrophorétique et excitation par une
source telle qu'un laser. Le signal est analysé par un
fluoromètre.

On obtient les courbes a (témoin) et b (ma-
25 lade), comme visible sur la figure 1, qui permet de
détecter au niveau de la position correspondant à une
éventuelle mutation, l'incorporation d'un ddATP en a,
pour l'individu sain et pour l'individu malade homozygote
en b, l'incorporation d'un ddTTP.

30 Exemple 2 : Microséquençage d'une base sur une séquence
d'acide nucléique (ADN du bacteriophage M13 mp8).

a) Matériel de départ

* ADN simple brin de bacteriophage M13mp8

* Oligonucléotide de synthèse dit Primer Universel de sé-
35 quence : 3'TGACCGGCAGCAAAATG5'

La première base incorporée sur l'amorce dans le sens 5'-->3' est un G.

b) Protocole

Le protocole est équivalent au protocole de
5 détection de mutation ponctuelle à partir de l'étape c de l'exemple 1. Les étapes a et b sont inutiles, l'ADN du phage M13 étant non contaminé par des oligonucléotides.

En variante, le protocole est le suivant :

- 3 µg d'A.D.N. simple-brin M13
- 10 - 15 ng d'oligonucléotide primer universel
- 7 µl de Tampon 5X Sequenase
- H₂O qsp 22 µl

La détection révèle l'incorporation sur le
primer d'un dideoxy GTP, ce qui correspond au résultat
15 attendu, comme visible sur la figure 2, qui montre les résultats obtenus avec deux dilutions différentes des ddNTP (1/200 (a) et 1/400ème (b)).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,
l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de
20 mises en oeuvres, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente inven-
25 tion.

REVENDICATIONS

- 1°) Procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :
- 5 (1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de réaction, ledit nucléotide s'hybridant avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;
- 10 (2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :
- 15 - d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'élongation dudit produit d'extension ;
- 20 (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.
- 25 2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.
- 3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.
- 30

4°) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

5°) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on dose, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation, ledit dosage de pyrophosphate permettant de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite.

8°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on détecte chaque base nucléotidique bloquante marquée.

9°) Kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs et tampons adaptés à la mise en oeuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide, servant d'amorce, capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;
- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées, de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension ; et

- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3'5'.

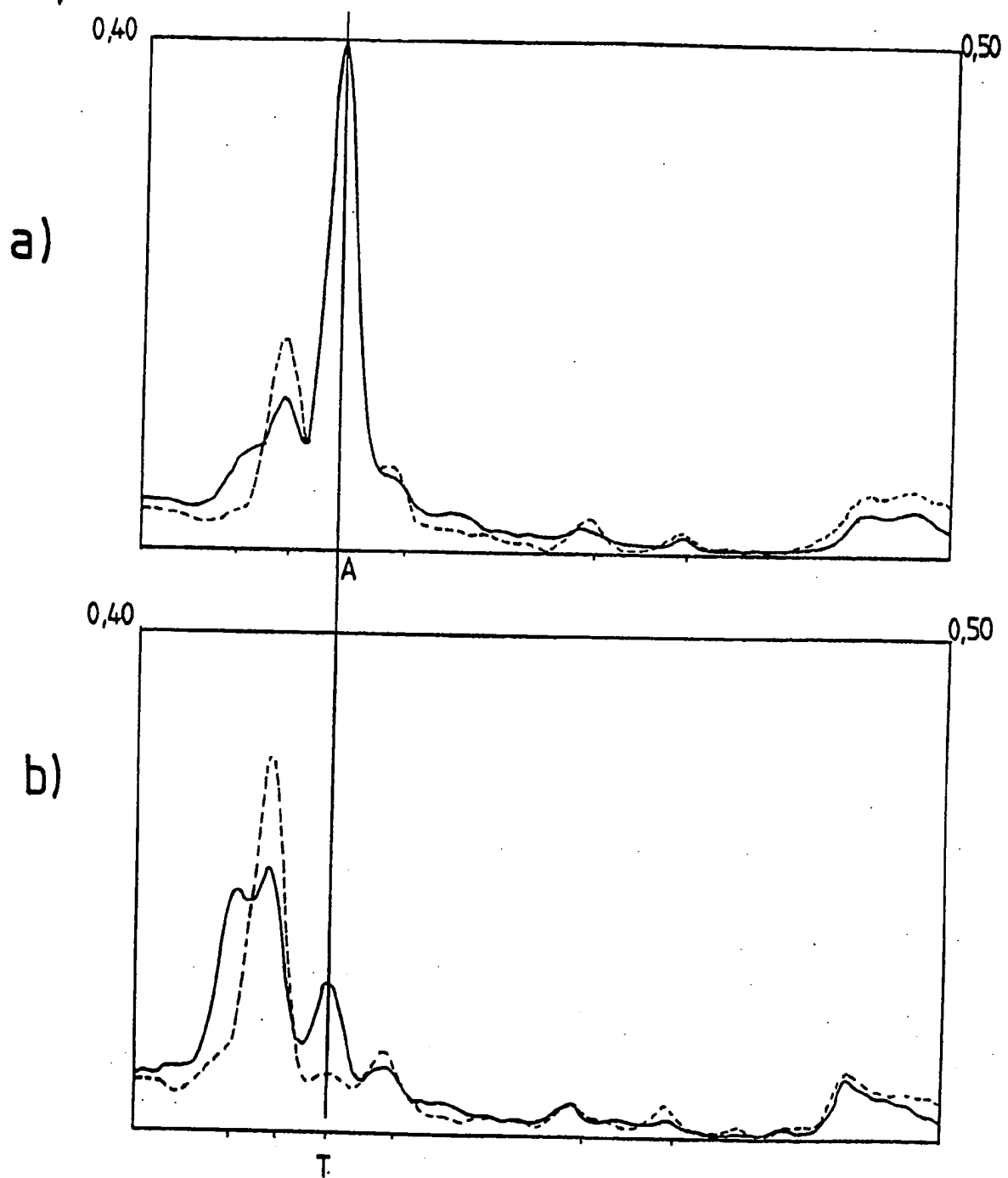
10*) Kit ou coffret selon la revendication 9, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées
5 sont des didésoxynucléotides.

11*) Kit ou coffret selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le
10 groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

12*) Kit ou coffret selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend,
15 en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

13*) Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, à la détection de la présence de séquences d'acides nucléiques particulières
20 associées à des maladies, telles que maladies génétiques ou maladies cancéreuses, à des infections, ou propres à permettre l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

1/2

FIG. 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

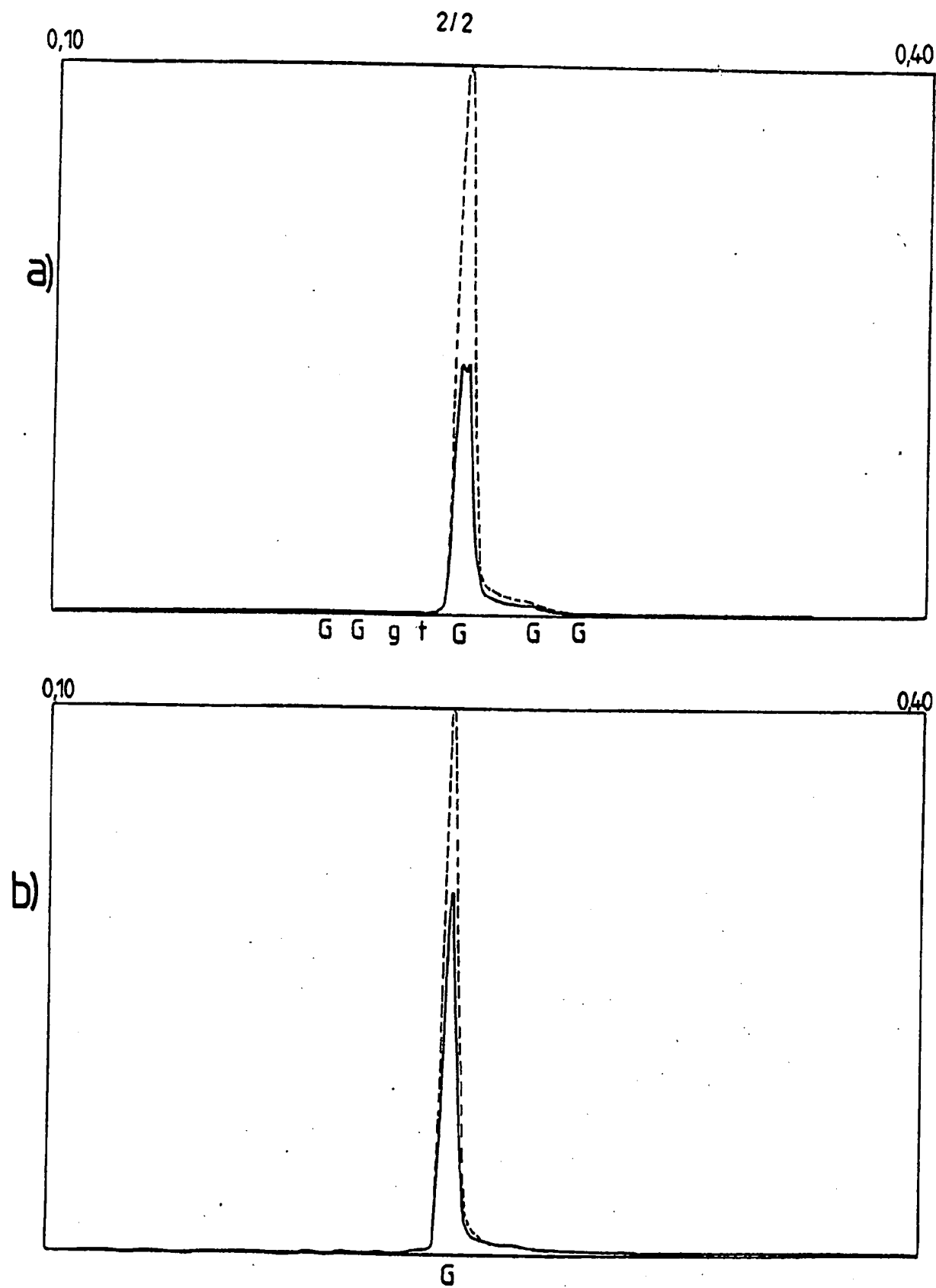


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR90/00585

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> Int.Cl.5 C12Q 1/68 </div>																				
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 25%;">Classification System</th> <th style="width: 75%;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="height: 40px; vertical-align: top; padding: 5px;">Int.Cl.5</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">C12Q</td> </tr> </table> <div style="margin-top: 10px; font-size: small;"> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸ </div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl.5	C12Q														
Classification System	Classification Symbols																			
Int.Cl.5	C12Q																			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0223618 (NEW YORK MEDICAL COLLEGE) 27 May 1987 see the whole document --- </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-13</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0123513 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) 31 October 1984 see the whole document & US, A, 4656125 (cited in the application) --- </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-13</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0141382 (FUJI PHOTO FILM CO.) 15 May 1985 see abstract; pages 10,11 --- </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;"> WO, A, 88/05470 (PRESIDENT & FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 28 July 1988 see the whole document --- </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P,A</td> <td style="padding: 5px;"> EP, A, 0332435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 13 September 1989 see abstract; pages 2-9 ----- </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-11</td> </tr> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	Y	EP, A, 0223618 (NEW YORK MEDICAL COLLEGE) 27 May 1987 see the whole document ---	1-13	Y	EP, A, 0123513 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) 31 October 1984 see the whole document & US, A, 4656125 (cited in the application) ---	1-13	A	EP, A, 0141382 (FUJI PHOTO FILM CO.) 15 May 1985 see abstract; pages 10,11 ---	1-11	A	WO, A, 88/05470 (PRESIDENT & FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 28 July 1988 see the whole document ---	1-11	P,A	EP, A, 0332435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 13 September 1989 see abstract; pages 2-9 -----	1-11
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³																		
Y	EP, A, 0223618 (NEW YORK MEDICAL COLLEGE) 27 May 1987 see the whole document ---	1-13																		
Y	EP, A, 0123513 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) 31 October 1984 see the whole document & US, A, 4656125 (cited in the application) ---	1-13																		
A	EP, A, 0141382 (FUJI PHOTO FILM CO.) 15 May 1985 see abstract; pages 10,11 ---	1-11																		
A	WO, A, 88/05470 (PRESIDENT & FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 28 July 1988 see the whole document ---	1-11																		
P,A	EP, A, 0332435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 13 September 1989 see abstract; pages 2-9 -----	1-11																		
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>																				
IV. CERTIFICATE <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 27 November 1990 (27.11.90) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 18 December 1990 (18.12.90) </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority European Patent Office </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 27 November 1990 (27.11.90)	Date of Mailing of this International Search Report 18 December 1990 (18.12.90)	International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer														
Date of the Actual Completion of the International Search 27 November 1990 (27.11.90)	Date of Mailing of this International Search Report 18 December 1990 (18.12.90)																			
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer																			

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9000585
SA 39509

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/12/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0223618	27-05-87	US-A- 4863849 JP-A- 62085863	05-09-89 20-04-87
EP-A- 0123513	31-10-84	CA-A- 1219793 DE-A- 3469366 JP-A- 59208465 US-A- 4656127	31-03-87 24-03-88 26-11-84 07-04-87
EP-A- 0141382	15-05-85	JP-A, B, C 60093354 CA-A- 1257184	25-05-85 11-07-89
WO-A- 8805470	28-07-88	US-A- 4795699 AU-A- 1022488 EP-A- 0265293 EP-A- 0386857 EP-A- 0386858 EP-A- 0386859 JP-A- 63237798 US-A- 4942130 US-A- 4921794 US-A- 4946786	03-01-89 21-07-88 27-04-88 12-09-90 12-09-90 12-09-90 04-10-88 17-07-90 01-05-90 07-08-90
EP-A- 0332435	13-09-89	AU-A- 3124689 JP-A- 2042999	14-09-89 13-02-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00585

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : C 12 Q 1/68		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 12 Q	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	EP, A, 0223618 (NEW YORK MEDICAL COLLEGE) 27 mai 1987 voir le document en entier --	1-13
Y	EP, A, 0123513 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) 31 octobre 1984 voir le document en entier & US, A, 4656125 (cité dans la demande) --	1-13
A	EP, A, 0141382 (FUJI PHOTO FILM CO.) 15 mai 1985 voir l'abrégé; pages 10,11 --	1-11
A	WO, A, 88/05470 (PRESIDENT & FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 28 juillet 1988 voir le document en entier -- ./.	1-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICAT N		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 27 novembre 1990	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 18 DEC 1990	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé Mme N. KUIPER	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
P,A	EP, A, 0332435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 13 septembre 1989 voir l'abrégé; pages 2-9 -----	1-11

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000585
SA 39509

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11/12/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0223618	27-05-87	US-A- 4863849 JP-A- 62085863	05-09-89 20-04-87
EP-A- 0123513	31-10-84	CA-A- 1219793 DE-A- 3469366 JP-A- 59208465 US-A- 4656127	31-03-87 24-03-88 26-11-84 07-04-87
EP-A- 0141382	15-05-85	JP-A, B, C 60093354 CA-A- 1257184	25-05-85 11-07-89
WO-A- 8805470	28-07-88	US-A- 4795699 AU-A- 1022488 EP-A- 0265293 EP-A- 0386857 EP-A- 0386858 EP-A- 0386859 JP-A- 63237798 US-A- 4942130 US-A- 4921794 US-A- 4946786	03-01-89 21-07-88 27-04-88 12-09-90 12-09-90 12-09-90 04-10-88 17-07-90 01-05-90 07-08-90
EP-A- 0332435	13-09-89	AU-A- 3124689 JP-A- 2042999	14-09-89 13-02-90

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82